

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/573, 33/543, A61K 38/45, G01N 33/68, 33/564	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/03872 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Januar 1998 (29.01.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03740 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. Juli 1997 (14.07.97) (30) Prioritätsdaten: 196 30 557.8 18. Juli 1996 (18.07.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHUPPAN, Detlef [DE/DE]; Markelstrasse 28, D-12163 Berlin (DE). DIETERICH, Wal- burga [DE/DE]; Kreuznacher Strasse 17, D-14197 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EHNIS, Tobias [DE/DE]; Kreuznacher Strasse 17, D-14197 Berlin (DE). (74) Anwälte: ZIEBIG, Marlene, K. usw.; Lützowplatz 11-13, D- 10785 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: IMMUNOLOGICAL PROCESS FOR DETECTING ANTIBODIES DIRECTED TOWARDS TISSUE TRANSGLUTAMI- NASE (TTG), USE OF TTG FOR DIAGNOSTIC PURPOSES AND THERAPY CONTROL, AND ORAL PHARMACEUTI- CAL AGENT CONTAINING TTG		
(54) Bezeichnung: IMMUNOLOGISCHES NACHWEISVERFAHREN VON ANTIKÖRPERN, DIE GEGEN GEWEBE- TRANSGLUTAMINASE (TG) GERICHTET SIND, VERWENDUNG VON (TG ZUR DIAGNOSE UND THERAPIEKONTROLLE SOWIE ORALES PHARMAZEUTISCHES MITTEL ENTHALTEND (TG		
(57) Abstract The invention concerns a process for detecting antibodies from body fluids by an immunoreaction with tissue transglutininase (tTG), with tTG-containing compounds, their antigenic structures, immunoreactive sequences or analogues. The process can be used for diagnostic purposes and therapy control for diseases which are associated with an immunoreaction to tTG, tTG-containing compounds, their antigenic structures, immunoreactive sequences or analogues. The invention also concerns the use of tTG and said substances for diagnostic purposes and therapy control, preferably for the diagnosis and therapy control of chronically inflammatory diseases or autoimmune diseases, more particularly for diagnosing and controlling therapy for sprue or celiac. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern aus Körperflüssigkeiten durch eine Immunreaktion mit Gewebe-Transglutaminase (tTG), mit tTG-enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga. Das Verfahren kann zur Diagnose und Therapiekontrolle von Erkrankungen dienen, die mit einer Immunreaktion gegen tTG, tTG-enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga verbunden sind. Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von tTG und den genannten Substanzen zur Diagnose und Therapiekontrolle, bevorzugt zur Diagnose und Therapiekontrolle von chronisch entzündlichen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen, ganz besonders bevorzugt zur Diagnose und Therapiekontrolle der Sprue oder Zöliakie.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

10

Immunologisches Nachweisverfahren von Antikörpern, die gegen Gewebe-Transglutaminase (tTG) gerichtet sind, Verwendung von tTG zur Diagnose und Therapiekontrolle sowie orales pharmazeutisches Mittel enthaltend tTG

15

20

Beschreibung

25 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern aus Körperflüssigkeiten durch eine Immunreaktion mit Gewebe-Transglutaminase (tTG), deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga sowie mit tTG-
30 enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga. Das Verfahren kann zur Diagnose und Therapiekontrolle von Erkrankungen dienen, die mit einer Immunreaktion gegen tTG, tTG-enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga verbunden sind. Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von tTG und den genannten Substanzen zur Diagnose und Therapiekontrolle, bevorzugt zur
35 Diagnose und Therapiekontrolle von chronisch entzündlichen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen, ganz besonders bevorzugt zur Diagnose und Therapiekontrolle der Sprue oder Zöliakie. Gegenstand der Erfindung ist auch ein orales pharmazeutisches Mittel, das tTG, tTG-enthaltende Verbindungen, deren antigene Strukturen, deren immunreaktive Sequenzen oder deren Analoga als Wirkstoff enthält und zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen diese
40 Substanzen einhergehen, eingesetzt werden kann, da durch die orale Gabe der genannten Verbindungen eine Immuntoleranz erzeugt wird.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, daß die Gewebe-Transglutaminase (tTG, EC 2.3.2.13) das Autoantigen der Sprue bzw. der Zöliakie ist.

Auf der Basis dieser Erkenntnis wurde das erfindungsgemäße immunologische Verfahren
5 zum Nachweis von Antikörpern gegen tTG und tTG enthaltende Verbindungen
entwickelt.

Die Zöliakie ist eine Erkrankung der Dünndarmschleimhaut mit Erstmanifestation
vorwiegend im späten Säuglings- und Kleinkindalter. Tritt das entsprechende
10 Krankheitsbild erst beim Erwachsenen auf, so wird sie als einheimische Sprue bezeichnet.
Beide Begriffe bezeichnen also die gleiche Krankheit. Die Sprue geht mit einer
entzündlichen Veränderung der Mukosa und einer dadurch verursachten generalisierten
Malabsorption einher. Sie reagiert meist morphologisch und klinisch auf eine Behandlung
mit glutenfreier Diät.

15

Als krankheitsauslösende Faktoren sind die Klebereiweiße (Glutene) von Weizen,
Gerste, Roggen und z.T. Hafer bekannt, während die von phylogenetisch weniger
verwandten Pflanzenarten wie Mais, Reis und Soja nicht pathogen sind. Unter den
Glutenen wird den alkohollöslichen Prolaminen, speziell dem α -Gliadin, die Rolle des
20 krankheitsauslösenden Agens zugeschrieben.

Die Sprue tritt daher bevorzugt in Ländern auf, in denen Weizen als wichtige
Nahrungsquelle dient (Europa, USA, Australien) und besitzt z.B. eine Inzidenzrate von
0,14/1000 Neugeborener in Dänemark, 0,7/1000 in Spanien, 1/1000 in Italien, 0,45/1000
in Deutschland und 2,42/1000 in Schweden.

25 Neuere Untersuchungen belegen jedoch, daß eine subklinische Ausprägung, d.h. eine
morphologische Veränderung der Mukosa ohne schwerwiegende Symptome, weit
häufiger als bislang vermutet auftritt. So zeigte eine 1994 in Italien durchgeführte Studie
eine Inzidenz von 3,28/1000 bei Schulkindern. Das Risiko einer latenten Sprue bei
Verwandten 1. Grades von Sprue-Patienten liegt bei bis zu 50 %.

30

Mit einer vorwiegend latenten Sprue einhergehend tritt gehäuft eine polymorphe
Dermatose, die Dermatitis herpetiformis auf, wobei charakteristische subepidermale
Bläschen mit granulären IgA-Ablagerungen in den dermalen Papillenspitzen zu
beobachten sind. Dünndarmbiopsien zeigen eine unregelmäßige, mehr oder weniger stark
35 geschädigte Mukosa.

Eine weitere gesicherte Assoziation ist zwischen der Sprue und dem Insulin-abhängigen Diabetes mellitus, Schilddrüsenerkrankungen, sowie einer selektiven IgA-Defizienz zu beobachten.

Neben zahlreichen klinischen Begleiterscheinungen der Sprue, wie z.B. einer Anämie, die u.a. einer Vitamin B₁₂-Malabsorption zugeschrieben wird und einem Vitamin K-Mangel, auf den eine erhöhte Blutungsneigung zurückzuführen ist, spielt das stark erhöhte Risiko gastrointestinaler Malignome eine besondere Rolle. Bis zu 15 % der Sprue-Patienten entwickeln, meist im Alter über 50 Jahren, neoplastische Erkrankungen, von denen etwa 50 % auf intestinale T-Zell-Lymphome und weitere 25 % auf Ösophagus-, Oropharynx- und Dünndarm-Tumore entfallen.

Die Therapie der Sprue besteht in der strikten Einhaltung einer lebenslangen glutenfreien Diät, wobei nicht nur Gluten enthaltende Produkte aus Weizen, sondern auch aus Roggen, Gerste und Hafer ausgeschlossen werden müssen. Dies bedeutet für die Patienten gravierende Einschränkungen sowohl der Essensgewohnheiten als auch der sozialen Interaktionen.

20

Sofern die Sprue rechtzeitig diagnostiziert und therapiert wird, besitzt sie eine gute Prognose. Jedoch sind aufgetretene Komplikationen häufig nicht gänzlich reversibel. Wird die Krankheit dagegen nicht erkannt und behandelt, so kann es durch Malabsorption zu schwerwiegenden Krankheitserscheinungen kommen. Letztendlich besteht das erhöhte Risiko einer Entwicklung eines intestinalen Lymphoms, sowie anderer gastrointestinaler Neoplasien.

Für die Diagnose der Sprue und der Verlaufskontrolle unter glutenfreier Diät ist gegenwärtig die Dünndarm-Biopsie der Goldstandard. Zunehmend gewinnen aber auch nicht-invasive Methoden der Diagnostik an Bedeutung, die auf immunologischen Markern beruhen. Da in den Seren der Sprue-Patienten Antikörper der IgA- und der IgG-Klasse vorkommen, die zum einen gegen Gliadin gerichtet sind und zum anderen gegen ein Autoantigen des Endomysiums, einem speziellen Bindegewebe, das u. a. die Kollagene I, III und V, elastische Fasern, nichtkollagene Proteine wie z. B. Fibronectin und Proteoglykane enthält, können die Seren im ELISA auf IgG- und IgA-Antikörper

35

5 gegen Gliadin, sowie durch indirekte Immunfluoreszenz auf IgG- und IgA-Antikörper gegen Endomysium getestet werden. Während Antikörper gegen Gliadin nicht spezifisch genug für die Sprue sind, wird für die IgA-AK gegen Endomysium eine hohe Sensitivität und Spezifität (97-100 %) berichtet. Für den Immunfluoreszenz-Nachweis werden jedoch Ösophagusschnitte von Primaten benötigt. Gegenwärtig gibt es Versuche, die Endomysium-Antikörper auch auf Nabelschnurmaterial nachzuweisen.

10

Bei rechtzeitiger Diagnose und konsequenter Einhaltung einer glutenfreien Diät kann die Erkrankung in Remission gehalten und damit auch das erhöhte Malignom-Risiko der Patienten auf den Normalwert gesenkt werden. Es ist folglich von großem Interesse, einen geeigneten Nachweistest für die Sprue zu entwickeln. Da der Personenkreis mit 15 einer latenten Sprue ebenfalls zur Risikogruppe gehört, sollten alle in Betracht kommenden Personen (vor allem Verwandte 1. Grades), letztendlich alle Schulkinder, wie dies in Italien zur Zeit erwogen wird, mit einem sensitiven, spezifischen, leicht durchführbaren und preiswerten Test untersucht werden.

Große Screening-Programme scheiterten bisher jedoch an folgenden Problemen:

- 20 - Die invasiven Duodenal-Biopsien symptomfreier Personen sind unzumutbar und viel zu aufwendig.
- Ein auf Antikörpern gegen Gliadin beruhender ELISA-Nachweis ist aufgrund seiner geringen Spezifität kaum brauchbar.
- Der auf Primaten-Ösophagus basierende Immunfluoreszenz-Nachweis von 25 Endomysium-Antikörpern der IgA-Klasse ist als generelle Screeningmethode zu aufwendig. Ferner ist die Beurteilung subjektiv und erlaubt nicht die Erfassung von Sprue-Patienten mit einer IgA-Defizienz (2 % der Patienten).

30 Es existiert also bisher kein nicht-invasiver, spezifischer, quantitativer, schnell, leicht und kostengünstig durchzuführender Nachweistest für die Sprue/Zöliakie und deren Therapie-Kontrolle.

Dieses Problem wird durch die vorliegende Erfindung gelöst. Basierend auf der überraschenden Erkenntnis, daß die Gewebe-Transglutaminase (tTG, EC 2.3.2.13) das 35 Autoantigen der Sprue ist, wurde ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von

Antikörpern gegen tTG und tTG enthaltende Verbindungen aus Körperflüssigkeiten,
5 insbesondere aus dem Serum, gemäß der Ansprüche 1 bis 6 entwickelt, womit nicht nur
die Sprue oder Zöliakie diagnostiziert werden kann, sondern alle Erkrankungen, die mit
einer Immunreaktion gegen tTG, tTG enthaltende Verbindungen, deren antigene
Strukturen, immunreaktive Sequenzen oder Analoga einhergehen.

- 10 Die Gewebe-Transglutaminase gehört zur Klasse der Transglutaminasen. Die TGn (EC
2.3.2.13) sind Enzyme, die Ca^{2+} -abhängig einen Acyltransfer katalysieren, wobei die γ -
Carboxamidgruppen von Peptid-gebundenen Glutaminresten als Acyl-Donoren agieren.
Als Acyl-Akzeptoren dienen primär proteingebundene Lysinreste, so daß der Transfer in
einer ϵ -(γ -Glutamyl-) Lysin-Bindung resultiert. Die Substratspezifität der TGn bezüglich
15 der Acyl-Donoren ist sehr hoch (Abhängigkeit von der Aminosäure-Sequenz),
wohingegen ein außergewöhnlich breites Spektrum an Akzeptoren zur Verfügung steht.
Die entstandenen kovalenten Peptidbindungen sind sehr stabil und proteaseresistent,
wodurch sich eine erhöhte Beständigkeit der vernetzten Proteine gegenüber chemischen,
enzymatischen oder physikalischen Einflüsse ergibt.
- 20 Mit dem weitverbreiteten Vorkommen verschiedener TGn in diversen Organen,
Geweben, im Plasma und in interstitiellen Körperflüssigkeiten korreliert auch das
Vorkommen von durch Transglutaminase modifizierten Proteinen im Blutgerinnsel, auf
Zellmembranen, in der Hornschicht der Epidermis, in Haaren, Nägeln und in der
extrazellulären Matrix.
- 25 Die beschriebenen Transglutaminasen lassen sich durch ihre physikalischen
Eigenschaften, ihre Lokalisation im Körper und ihre Primärstruktur unterscheiden.

Die Gewebe-TG (tTG) wird auch zelluläre, Erythrozyten-, endotheliale,
zytoplasmatische, Leber- oder Typ II-TG genannt und ist ein Monomer mit einem
30 Molekulargewicht von 75-85 kDa.

Die komplette Aminosäuresequenz mit 687 Resten wurde von der cDNA abgeleitet. Auf
Protein-Ebene besteht eine 84 %ige Homologie zwischen dem menschlichen Enzym und
dem Enzym aus Mausmakrophagen, sowie eine 81 %ige Homologie zwischen dem
menschlichen und dem Meerschweinchen-Enzym. Nukleotidaustausche zwischen den
35 Spezies sind oftmals ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Stark konserviert ist

das aktive Zentrum mit einer ausgeprägten Protein-Homologie zwischen den drei Spezies
5 (49 von 51 Resten sind identisch) und einem hohen Grad an Protein-Homologie (75 %) zur α -Untereinheit des Faktor XIII.

Es liegen weder ein Signalpeptid noch eine Glykosylierung vor, und trotz mehrerer Cysteinreste existieren offenbar keine Disulfidbrücken. Fluoreszenz-Hybridisierungen lokalisierten das Gen für die humane Gewebe-Transglutaminase auf dem Chromosom
10 20q12. Obwohl der Mechanismus der Enzym-Ausschleusung noch unklar ist, gibt es eindeutige Belege, daß die intrazellulär ubiquitär vorkommende tTG in der extrazellulären Matrix (EZM) wichtige Aufgaben übernimmt. Zudem wird die für die Aktivität der tTG erforderliche Ca^{2+} -Konzentration unter physiologischen Bedingungen intrazellulär kaum erreicht, während im Extrazellulärraum dagegen ausreichend hohe
15 Ca^{2+} -Konzentrationen vorliegen.

Mehrere Untersuchungen belegen eine Assoziation von tTG mit dem EZM-Protein Fibronectin. Neben Fibronectin konnten auch die EZM-Moleküle Nidogen, das N-terminale Prokollagen III-Peptid, die Kollagene V und XI, Osteonectin, ein Mikrofibrillen-assoziiertes Glykoprotein, hochmolekulares Dermatan Sulfat-
20 Proteoglykan und das Lektin Galectin 3 als spezifische Substrate für die tTG identifiziert werden.

Hinweise für eine wichtige Rolle der tTG an der Wundheilung kamen u.a. von Immunfluoreszenz-Studien an kultivierten WI38-Zellen (embryonalen Lungenfibroblasten), die unter Normalbedingungen keine extrazelluläre tTG-Aktivität
25 aufweisen, das Enzym jedoch nach künstlicher Wundsetzung extrazellulär ablagern. Dem möglicherweise passiven Austritt des Enzyms aus geschädigten Zellen schließt sich eine zunächst nicht-kovalente Bindung an die EZM, insbesondere an Fibronectin und fibrilläre Kollagene an. Dort ist das Enzym einige Stunden katalytisch aktiv. Am Rattenmodell wurde, ebenfalls nach künstlicher Wundsetzung, 5 Tage lang eine erhöhte tTG-Aktivität
30 nachgewiesen. Auch bei der Inkubation von humanen Erythrozytenlysaten mit Plasma konnte eine starke Affinität der freigesetzten tTG an Fibronectin demonstriert werden. Alle Befunde deuten darauf hin, daß die an die EZM gebundene tTG eine zentrale Rolle in der frühen Phase der Wundheilung übernimmt, insbes. zusammen mit Faktor XIIIa bei der Fibrin-Stabilisierung mitwirkt und durch ein Quervernetzen von extrazellulären
35 Proteinen eine Schutzschicht und ein stabiles adhäsives Substrat um die geschädigten

Zellen bildet. Bisher konnten in Vertebraten keine Enzyme nachgewiesen werden, die in
5 der Lage sind, die von der tTG katalysierten, überaus stabilen Quervernetzungen der
Proteine zu spalten.

Basierend auf der Erkenntnis, daß die tTG das Autoantigen der Sprue ist, ist auch die
Verwendung von tTG, tTG-enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen,
immunreaktiven Sequenzen oder Analoga zur Diagnose und Therapiekontrolle von
10 Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen diese Verbindungen einhergehen,
Gegenstand der Erfindung. Insbesondere können so akute entzündliche Erkrankungen
wie z.B. Pneumonie, Glomerulonephritis, Virushepatitis oder chronisch entzündliche
Erkrankungen wie z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Autoimmunerkrankungen
wie z.B. Autoimmunhepatitis, Sjögrens Syndrom, Wegnersche Granulomatose,
15 rheumatoide Arthritis, idiopathische Organfibrose wie z.B. Lungenfibrose diagnostiziert
werden. Ganz besonders geeignet ist das Nachweisverfahren zur Diagnose und
Therapiekontrolle der Sprue. Da sich der Test schnell und kostengünstig durchführen
läßt, ermöglicht er ein effizientes Screening der Bevölkerung auf tTG-Antikörper.

20 Die erfindungsgemäß eingesetzte tTG kann humanen, tierischen, synthetischen oder
rekombinanten Ursprungs sein, ebenso die tTG-enthaltenden Verbindungen, die
zusätzlich auch daraus kombinierten Ursprungs sein können (z.B. tierische tTG
verbunden mit synthetischem Peptid). Als tTG-enthaltende Verbindungen werden im
Sinne der Erfindung chemische Verbindungen der tTG mit Proteinen oder deren Analoga
25 verstanden. Als tTG-Analoga oder Analoga dieser tTG-enthaltenden Verbindungen
werden im Sinne der Erfindung alle antigenen Strukturen verstanden, die mit
Antikörpern gegen tTG oder tTG enthaltende Verbindungen eine Immunreaktion
eingehen, z.B. synthetische Peptide. Als immunreaktive Sequenzen sind proteolytisch,
synthetisch oder gentechnisch hergestellte Fragmente der tTG oder der tTG-enthaltenden
30 Verbindungen und deren durch Austausch von Aminosäuren erhaltene Varianten zu
verstehen.

Der erfindungsgemäße immunologische Nachweis wird mittels bekannter Methoden
durchgeführt. So kann zur Detektion der Patientenantikörper jedes beliebige direkte (z.
35 B. mit einem Sensorchip) oder indirekte Verfahren zur Anwendung kommen.

Bei den direkten Verfahren wird die Bindung der nachzuweisenden Antikörper an das
5 Antigen über eine Änderung der chemischen oder physikalischen Eigenschaften
bestimmt, so daß nachfolgende Detektionsschritte mit markierten Bindungspartnern nicht
notwendig sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt erfolgt der Nachweis der tTG-Antikörper in einem
10 Immunoassay, bevorzugt in einem Festphasenimmunoassay, unter direkter oder
indirekter Kopplung eines Reaktionspartners mit einer gut nachweisbaren
Markierungssubstanz. Besonders bevorzugt kann der Nachweis in einem ELISA, einem
RIA oder einem Fluoreszenzimmunoassay erfolgen. Die Durchführung dieser
Nachweisverfahren ist dem Fachmann gut bekannt.

15

So wird z.B. in einem ELISA das Antigen, im vorliegenden Fall z.B. tTG, direkt oder
indirekt an eine Trägersubstanz, wie beispielsweise Polystyrol, gebunden. Nach
Inkubation mit den nachzuweisenden Antikörpern, z.B. aus dem Serum von Patienten,
werden Antigen-gebundene Antikörper direkt oder indirekt mittels Enzym-gekoppelter
20 Substanzen nachgewiesen. Diese Substanzen können Antikörper, Fragmente von
Antikörpern oder hochaffine Liganden wie z.B. Avidin, das an eine Biotin-Markierung
bindet, sein. Als Enzyme kommen beispielsweise die Peroxidase, alkalische Phosphatase,
 β -Galaktosidase, Urease oder Glucoseoxidase in Betracht. Durch Zugabe eines
chromogenen Substrats können die gebundenen Enzyme und damit beispielsweise die
25 gebundenen tTG-Antikörper quantifiziert werden.

Auch in einem Radio-Immunoassay ist das Antigen, z.B. die tTG, direkt oder indirekt an
eine Trägersubstanz, wie beispielsweise Polystyrol, gebunden. Nach Inkubation mit den
nachzuweisenden Antikörpern, z.B. aus dem Serum von Patienten, werden Antigen-
30 gebundene Antikörper mittels Substanzen nachgewiesen, die eine radioaktive
Markierung, beispielsweise ^{125}I , tragen. Diese Substanzen können Antikörper, Fragmente
von Antikörpern oder hochaffine Liganden wie z.B. Avidin, das an eine Biotin-
Markierung bindet, sein. Die gebundene Radioaktivität kann mittels eines geeigneten
Meßgeräts quantifiziert werden.

35

Nach dem gleichen Prinzip werden in einem Fluoreszenzimmunoassay die Antigen- gebundenen Antikörper mittels Substanzen nachgewiesen, die eine Fluoreszenz-
5 Markierung, beispielsweise Fluorescein-Isothiocyanate (FITC) tragen. Diese Substanzen können Antikörper, Fragmente von Antikörpern oder hochaffine Liganden wie z.B. Avidin, das an eine Biotin-Markierung bindet, sein. Die gebundene Menge an Fluoreszenzfarbstoff wird dann mittels eines geeigneten Meßgeräts quantifiziert.

10 Erfindungsgemäß ist es auch möglich, die Patientenantikörper in einem Agglutinationstest oder Geldiffusionstest nachzuweisen. Auch diese Nachweisverfahren sind dem Fachmann bekannt. So werden beim Geldiffusionstest in benachbarte, naheliegende Vertiefungen von Agar- oder Agarose-Platten z.B. die Antigen- bzw. die Antikörper- Lösungen gefüllt. Im vorliegenden Fall kann die Antigenlösung
15 beispielsweise die tTG-Lösung und die Antikörperlösung beispielsweise Blutserum sein. Diffundieren die Substanzen aus ihren Vertiefungen, bilden sich ausgehend von den Vertiefungen Konzentrationsgradienten. Wenn die überlappenden Antigen- und Antikörper-Konzentrationen im Gel innerhalb bestimmter Verhältnisse liegen und die Antikörperlösung Antikörper gegen das Antigen enthält, bilden sich im Gel sichtbare
20 Präzipitate.

Beim Agglutinationstest werden Antigen (z.B. tTG)- tragende Partikel, z.B. aus Latex oder Polystyrol durch Antikörper, beispielsweise aus dem Serum, quervernetzt. Die gebildeten Aggregate lassen sich beispielsweise turbidimetrisch nachweisen.

25 Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugt wird der Nachweis mit einem IgA-spezifischen oder IgG-spezifischen ELISA im Serum von Sprue-Patienten durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, daß sich der auf der tTG basierende neu entwickelte ELISA-Nachweis von IgA-Antikörpern im Serum von Sprue-Patienten aufgrund seiner hohen
30 Sensitivität und Spezifität hervorragend zur Diagnostik und Therapie-Kontrolle der Sprue eignet. Dies wird auch bei der Verlaufs-Kontrolle der behandelten Patienten deutlich (Titer-Abfall unter Therapie). Ein Vergleich der erfindungsgemäßen ELISA-Daten mit den Immunfluoreszenz-Auswertungen Dritter (Nachweis von IgA anti-Endomysium) zeigt eine gute Übereinstimmung. Unstimmigkeiten treten vor allem bei
35 niedrigen Antikörper-Titern auf, was jedoch zu Lasten der bisher als Goldstandard

geltenden indirekten Immunfluoreszenz geht. Dies ist u.a. bedingt durch die subjektive Auswertung und die unspezifischen Begleitreaktionen dieser Methode des Standes der Technik.

Der entsprechende, auf Antikörpern anderer Klassen beruhende Nachweis, aufgezeigt am Beispiel der IgG-Antikörper, eignet sich zum Auffinden von Sprue-Patienten mit einer IgA-Defizienz sowie zur Untersuchung anderer Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen.

- 10 Eine weitere Verbesserung der Nachweismethode tritt bei Verwendung aufgereinigter tTG aus Meerschweinchen, humaner tTG, proteolytisch oder gentechnisch erhaltener immunreaktiver Sequenzen oder Analoga sowie synthetischer immunogener tTG-Peptide im Testsystem ein. Ein ELISA zur Diagnostik und Verlaufskontrolle anderer Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen, wird in Beispiel
15 3.3 beschrieben.

- Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein orales pharmazeutisches Mittel zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen tTG, tTG enthaltende Verbindungen, deren antigene Strukturen, immunreaktive Sequenzen oder
20 Analoga einhergehen, gemäß Anspruch 10. Vorzugsweise ist die orale Darreichungsform eine Tablette oder Kapsel. Dabei wird durch Verabreichung von tTG, tTG enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga eine orale Toleranz erzeugt. Die orale Toleranz wird zum einen durch die orale Zufuhr des Autoantigens erreicht, zum anderen existiert ein sog. „Bystander-Effekt“, sofern das
25 die Krankheit auslösende Autoantigen nicht bekannt ist, kann in einigen Fällen ein anderes Antigen, das im Zielorgan mit dem Immunsystem in Kontakt kommt, zur oralen Therapie verwendet werden. Dieses Antigen ist dann in der Lage, lokal die Antigen-spezifischen Suppressor-T-Zellen zu stimulieren und dadurch eine systemische Immunantwort zu unterdrücken. Erst bei höherer Antigen-Dosis wird eine Anergie
30 autoreaktiver T-Zellen ausgelöst.

Die orale Toleranz ist die praktische Behandlungsmethode von diversen Autoimmunerkrankungen.

Bevorzugt dient das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel zur Behandlung der Sprue, aber auch von anderen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und autoimmunen Hepatiden.

5

Erfindungsgemäß werden die tTG, die tTG-enhaltenden Verbindungen, deren antigene Strukturen, immunreaktive Sequenzen oder Analoga in einer Dosis 0,01-100mg/Kg Körpergewicht gegeben.

10

Das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel kann gegebenenfalls pharmazeutisch verträgliche Hilfsstoffe enthalten, wie z. B. in der Galenik übliche Füllstoffe, Gleitmittel, Spengmittel, Bindemittel oder Formentrennmittel. Der Anteil der pharmazeutischen Hilfsstoffe kann in Abhängigkeit vom gewählten Wirkstoffgehalt in weiten Grenzen variieren und beträgt jeweils 0,1 bis 20 Gew. %.

15

Die mit der vorliegenden Erfindung erreichten Vorteile bestehen sonst insbesondere in einem nicht-invasiven, hoch spezifischen, gegen das direkt mit der Erkrankung assoziierte Agens gerichteten Nachweistest für die Sprue und deren Therapie-Kontrolle. Darüberhinaus besteht der große Vorteil des entwickelten Tests in der schnellen, leicht und kostengünstigen Durchführbarkeit und der Standardisierbarkeit zwischen verschiedenen Labors. Der Test ermöglicht dadurch ein effizientes Screening der Bevölkerung auf Antikörper, gerichtet gegen die tTG.

20

Die Möglichkeit der quantitativen Auswertung der Test-Daten ist zudem durch deren Objektivität gegenüber der subjektiv geprägten Auswertung einer Immunfluoreszenz überlegen. Immunfluoreszenz-Auswertungen werden außerdem, vor allem bei niedrigen Titern, durch unspezifische Begleitreaktionen erschwert. Durch den Einsatz des spezifischen Autoantigens im Testsystem können die bei der Immunfluoreszenz auf Ösophagusmaterial von Primaten bzw. Nabelschnüren unspezifischen Reaktionen weitgehendst ausgeschaltet werden.

25

30

Da der Test sowohl auf Antikörper der IgA- als auch anderer Antikörper-Klassen anwendbar ist, werden auch Sprue-Patienten mit einer IgA-Defizienz erfaßt. Der auf Antikörpern gegen tTG beruhende Nachweis eignet sich ebenso zum Auffinden, zur Untersuchung und zur Therapiekontrolle anderer Erkrankungen, die mit einer Immunantwort gegen die tTG einhergehen.

35

Desweiteren besteht durch die Identifizierung der tTG als Autoantigen der Sprue die Möglichkeit, dieses in seiner Gesamtheit bzw. dessen immunreaktive Epitope
5 (proteolytisch oder gentechnisch hergestellte Sequenzen, Analoga oder synthetische Peptide) zur oralen Therapie der Sprue, sowie anderer Erkrankungen, die durch eine Immunantwort gegen die tTG gekennzeichnet sind, einzusetzen.

Ausführungsbeispiele

5

Beispiel 1

Isolierung und Charakterisierung des Autoantigens

1.1 Immunfluoreszenz, APAAP-Färbungen

- 10 Die Färbungen wurden auf verschiedenen, in 100 % Methanol über 2 min bei -20 °C fixierten Zelllinien, durchgeführt.

Beim Immunfluoreszenz-Nachweis wurden die Präparate mit Sprue- bzw. Kontrollseren inkubiert, gewaschen und mit einem TRITC-markierten anti-human-IgA aus Kaninchen detektiert (Schuppan et al., J. Biol. Chem. 1990;265:8823-32).

- 15 APAAP-Markierungen wurden nach Inkubation der Zellen mit den Sprue-Seren, Waschen und der darauffolgenden Detektion mit dem APAAP-Komplex durchgeführt (Cordell J. L. et al., J. Histochem. Cytochem. 1984;32:219-229)

- Dabei zeigten HT1080 (humane Fibrosarkom-Zellen), WI38 (humane embryonale Lungenfibroblasten), Hep1 und HepG2 (Hepatokarzinom-Zellen) mit den Patientenseren
20 eindeutig positive, zytoplasmatische Signale, wogegen Normalseren oder auch eine Vorbehandlung mit humanem IgA keine Markierung zeigten. Humane Vorhautfibroblasten, humane Rhabdomyosarkom (RD)- / Ratten-Ito- / Ratten-Morris-Hepatom- und Hund-MDCK-Zellen zeigten nur sehr schwache bis negative Reaktionen.

- 25 1.2. Metabolische Zellmarkierung und Immunpräzipitation des Autoantigens

Die Charakterisierung und Isolierung des Autoantigens wurde aus HT1080 Zellen durchgeführt.

- Die Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit L-Alanyl-L-Glutamine, 10 % fötalem Kälberserum (FKS, Gibco), 100 U/ml Penizillin und
30 100 µg/ml Streptomycin (Seromed) bei 37 °C und 8 % CO₂ kultiviert. Zur metabolischen Markierung wurden die Zellen in Kulturschalen mit 5 cm² Durchmesser überführt und bei Erreichen einer ~90 %-igen Konfluenz 2 h in Methionin- und FKS-freiem Medium gehalten, bevor dieses gegen 3 ml FKS-freies, ³⁵S- Methionin (0,2 mCi, Expre³⁵S³⁵S,
35 NEN-Dupont) enthaltendes Medium ausgetauscht wurde. Nach 16-20-stündiger

Inkubation wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed) gespült und anschließend in 3 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, 0,5 % nichtionisches Detergenz IGEPAL CA-630 [Sigma], Proteaseinhibitor Complete® [Boehringer], pH 7,5) lysiert. Im Anschluß wurde sowohl mit dem Medium als auch dem Zelllysate eine Immunpräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose 4B (Pharmacia) durchgeführt.

Die Aktivierung und Bindung an die Sepharose erfolgte nach Herstellerangaben. Nach dem Quellen und Waschen in 1 mM HCl, pH 2,5 wurde die CNBr-aktivierte Sepharose in 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3, mit einem gegen humanes IgA gerichteten Antikörper aus Kaninchen (Dianova, 2,4 mg Antikörper/ml Sepharose) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit dem Bindungspuffer entfernt, nicht besetzte Bindungsstellen durch Zugabe von 1 M Ethanolamin, pH 9,0, bei Raumtemperatur 2 h abgesättigt. Danach wurde die Sepharose 3 x alternierend (je 10 x Vol.) mit 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0, und 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0, gespült. Es folgte eine Inkubation der Sepharose mit Seren von Sprue-Patienten bzw. gesunden Personen (0,5 ml Serum/ml Sepharose) bei 4 °C über Nacht in Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 8,0). Überschüssige Serum-Antikörper wurden durch 3 x Spülen mit Bindungspuffer entfernt.

Je 1 ml HT1080-Medium oder Zelllysate (ca 5x10⁴ Zellen) der metabolisch markierten Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 50 µl Cl4B-Sepharose (Pharmacia) vorinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Nach Abzentrifugieren (10 000 x g, 5 min, 4 °C) wurden die Überstände mit je 50 µl der Sepharose, an die zuvor IgA der Patienten bzw. Kontrollpersonen gebunden wurde, über Nacht unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Sepharose-Pellets je 3 x mit 1 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, 1 % IGEPAL CA-630 [Sigma], 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % Natriumlaurylsulfat, Complete® [Boehringer], pH 8,0) gewaschen, gefolgt von 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Danach wurden die Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95 °C 5 min unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen inkubiert, im 10-12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Lämmli, U.K., Nature 1970;227:680-685) und in der Autoradiographie nachgewiesen (Abb.1).

Das gebundene hochmolekulare Protein aus dem Medium erwies sich bei weiteren
5 Untersuchungen als Fibronektin, welches u.a. unspezifisch an die Sepharose gebunden
wird.

Eine zellassoziertes Protein von 85 kDa konnte jedoch mit allen 30 bisher so
eingesetzten Sprue-Seren präzipitiert werden, während dies mit 15 Kontrollseren,
darunter Normalseren, Seren von Patienten mit Colitis Ulcerosa und Sjögrens-Syndrom,
10 nicht möglich war. Hieraus wurde gefolgert, daß dieses Protein das wesentliche
Autoantigen der Sprue repräsentiert.

Der autoradiographisch sichtbaren 85 kDa-Bande wurde in einer Proteinfärbung der Gele
mit Silbernitrat (Heukeshoven, J., et al., Electrophoresis 1985;6:103-112) eine scharfe
Proteinbande zugewiesen.

15

1.3. Isolierung und Aufreinigung des 85 kDa Autoantigens

Zur Isolierung größerer Mengen des Autoantigens wurden insgesamt 65 Kultuschalen (je
175 cm²) der HT1080 Zellen (etwa 10⁹ Zellen) kultiviert. Kurz vor Erreichen der
20 Konfluenz wurde das Medium gegen FKS-freies Medium ausgetauscht, gefolgt von einer
Inkubation über weitere 16-20 h im CO₂-Inkubator. Die Lyse bzw. Immunpräzipitation
erfolgten wie oben beschrieben. Das Sepharosepellet wurde in insgesamt 4,5 ml SDS-
Probenpuffer mit 2 % DL-Dithiothreitol (Sigma) 5 min bei 95 °C inkubiert, um
gebundene Proteine zu lösen und anschließend im analytischen SDS-Polyacrylamidgel
25 überprüft.

Zur weiteren Aufreinigung des Autoantigens wurde das Immunpräzipitat über eine
Elutionselektrophorese mit einer Prep Cell (Model 491 BIO-RAD) wie folgt aufgetrennt:
Auf ein Rundgel (Außen-Durchmesser 3 cm), bestehend aus 6,5 cm Trenngel (8 %
Polyacrylamid, pH 8,8) und 1,5 cm Sammelgel (4 % Polyacrylamid, pH 6,8) wurden die
30 4,5 ml des Proteingemisches aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die
einzelnen Proteine wurden im Elutionspuffer (25 mM Tris-HCl, 0,1 M Glycin, 0,01 %
SDS, pH 8,3) in Fraktionen à 1,2 ml (0,8 ml/min) gesammelt. Die eluierten Fraktionen
wurden in der SDS-PAGE kontrolliert und die das gewünschte Protein enthaltenden
Fraktionen (etwa 15 ml) vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltration (Amicon Centriprep-
35 50 bei 1000 x g) auf circa 1 ml Gesamtvolumen aufkonzentriert.

1.4. Protease-Verdau des Autoantigens

5

Unter mehreren getesteten Proteasen wurde die Endoproteinase Asp-N (sequencing grade, Boehringer Mannheim) als zur Fragmentierung geeignet ermittelt, da sie ein weitestgehend reproduzierbares Spaltmuster mit relativ gut trennbaren Fragmenten ermöglichte. Die Enzym- zu Substratkonzentration wurde auf 1:100 eingestellt und der

10 Verdau über 30 min bei 37 °C durchgeführt.

1.5. Transfer auf PDVF-Membran

15

Nach Verdau des aufgereinigten Autoantigens wurden die Peptidfragmente auf einem präparativen 10 % Tricine-Gel aufgetrennt (Schägger, H. et al., Anal. Biochem. 1987;166:368-379) (Abb.2) und bei 4 °C im Semi-Dry-Fastblot-Verfahren unter Verwendung graphithaltiger Elektrodenplatten (Fastblot B32/33, Biometra) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, ImmobilonTM, Millipore) transferiert. Dazu wurden folgende Schichten auf die Anodenplatte gelegt: 1.) ein Filterpapier, getränkt in

20 Anodenpuffer 1 (300 mM Tris-HCl, 20 % Methanol, pH 10,4), 2.) ein Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer 2 (30 mM Tris-HCl, 20 % Methanol, pH 10,4), 3.) die PVDF-Membran, aktiviert in Methanol und präequilibriert in Anodenpuffer 2, 4.) das Tricine-Gel, 5.) zwei Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer (25 mM Tris-HCl, 40 mM ε-Amino-n-Caprinsäure, 20 % Methanol, pH 9,4), 6.) die Kathodenplatte. Der Transfer

25 wurde 35 min bei 180 mA durchgeführt.

30

Die PVDF-Membran wurde daraufhin in 0,1 % Coomassie Blue Serva R-250, 50 % Methanol für 5 min gefärbt, mit 50 % Methanol, 10% Essigsäure entfärbt, gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Charakteristische Banden des verdauten Autoantigens bei 10 kDa, 14 kDa, 16 kDa und 25 kDa wurden sorgfältig

ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert.

1.6. Edman-Abbau

- 5 (gemäß Edman and Henschen in: Needleman, S.B.: Protein Sequence Determination, Springer Verlag, Berlin. 1975;232-279)

Die Sequenzierung in einem Applied Biosystems 4778-Sequenator ergab drei Aminosäure-Sequenzen, welche mit der Swiss-Prot 31 Datenbank (von PC/GENE, IntelliGenetics) verglichen wurden. Daraus konnte bei minimaler Diskordanz, eine eindeutige Zuordnung der drei Fragmente zur humanen Gewebe-Transglutaminase (tTG, EC 2.3.2.13, Protein-Glutamin Gamma-Glutamyltransferase) gemacht werden; die Angaben erfolgen im 'one letter code', X bedeutet keine Identifizierung:

15 t-Transglutaminase: 28' REKLVVRRGQPFW
10 kDa-Fragment: REKLVVRRGQPF(S)

t-Transglutaminase: 581' DLYLENPEIKIRILG
14 kDa-Fragment: DLYLENPEIXIXILG

20 t-Transglutaminase: 438' DITHITYKYPE
16 kDa-Fragment: DITLTYQYP(V)

Dem 25 kDa-Fragment konnte keine eindeutige Sequenz zugeordnet werden, da es sich dabei um ein Peptidgemisch handelt.

Beispiel 2**Bestätigung der Gewebe-Transglutaminase (tTG) als Sprue-Autoantigen****2.1. Immunpräzipitation der tTG vom Meerschweinchen**

30

Bei kommerzieller Verfügbarkeit und einer Sequenz-Homologie (>80 %) zur humanen tTG wurde die tTG aus der Leber des Meerschweinchens (Sigma) zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt, um dessen Reinheit zu überprüfen. Die tTG stellt dabei neben mehreren anderen Proteinen mit ca 50 % eine der Hauptbanden dar.

35

Obwohl sich die humane tTG mit 687 Aminosäuren nur geringfügig vom
5 Meerschweinchenprotein mit 690 Aminosäuren unterscheidet, besitzen die beiden
Proteine ein sehr unterschiedliches Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel. Während
das Protein tierischen Ursprungs erwartungsgemäß bei 75-80 kDa erscheint, wandert das
humane Protein deutlich weniger schnell und täuscht, wie auch in der Literatur
beschrieben, trotz offenbar fehlender N-Glykosylierung ein apparentes Molekulargewicht
10 von 85 kDa vor (Gentile, V., et al., J. Biol. Chem. 1991;266:478-483)

Die Reaktivität des menschlichen Auto-Antikörpers aus Sprue-Seren mit der
Meerschweinchen-tTG wurde in einer Immunpräzipitation getestet. Dazu wurden 4µg
tTG (Sigma) in 500µl Lysispuffer, 0,5 % Rinderserumalbumin mit an 4B-Sepharose
gekoppeltem Sprue-IgA bei 4 °C über Nacht geschüttelt, gewaschen, in SDS-
15 Probenpuffer unter reduzierenden Bedingungen gekocht und im 10 % Polyacrylamidgel
aufgetrennt (s. 4.1.2.). Hier zeigte sich eine spezifische Präzipitation der erwarteten
Bande (M_r 80 kDa) nicht aber der Verunreinigung.

2.2. Bestätigung der tTG als Autoantigen im Westernblot

20

Nach Auftrennung von 2 µg der tTG aus Meerschweinchen im SDS-Gel und Transfer
auf Nitrozellulose wurde der Blot bei 4 °C in PBS, 2 % fettarmen Magermilchpulver, 0,3
% Tween 20, pH 7,3 über Nacht blockiert. Es folgten eine einstündige Inkubation mit
Sprue-Serum (1/200) in demselben Puffer, drei Waschschrte und eine einstündige
25 Inkubation mit an alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpern aus Kaninchen
gegen humanes IgA (1/500). Die Blots wurden in PBS gewaschen und mit Nitro Blue
Tetrazolium und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat als Substrat entwickelt (Blake,
M.S., et al., Anal. Biochem. 1984;136:175-179)

Die 75-80 kDa-Bande ergab ein eindeutiges positives Signal mit dem Sprue-Serum, als
30 weiterer Beweis dafür, daß die Seren von Sprue-Patienten Antikörper der IgA-Klasse
gegen die tTG enthalten, während Kontrollseren kein Signal ergaben.

2.3. Bestätigung der tTG als das Endomysium-Autoantigen in der indirekten

5 Immunfluoreszenz

Ösophagus-Gewebeschnitte von Primaten (Euroimmun, Deutschland) wurden zum indirekten Nachweis der IgA-Antikörper gegen Endomysium in Sprue-Seren, bzw. deren Inhibition durch tTG verwendet. Nach Vorinkubation von 10 µl des 1/320 in PBS verdünnten Patientensерums mit 0,5 oder 10 µg tTG aus Meerschweinchen (Sigma) bzw. 10 µg BSA (Sigma) über 1h bei Raumtemperatur, erfolgte dessen Inkubation mit den Ösophagus-Schnitten 1 h bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre. Zur Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle dienten Sprue-Serum (1/320) bzw. Seren von Gesunden (1/50). Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in PBS/ 0,2% BSA und Lufttrocknen wurde die

15 Detektion des Autoantigens mit einem TRITC-markierten, gegen humanes IgA gerichteten, Antikörper aus Kaninchen (Dianova), 1/50 in PBS verdünnt, 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Überschüssige Antikörper wurden durch sukzessives Waschen mit PBS/0,2 % BSA, PBS und destilliertem Wasser entfernt.

Das Patientenserum zeigte eine deutliche Anfärbung der EZM durch die Antikörper der

20 IgA-Klasse, die durch Zugabe von steigenden Konzentrationen an tTG inhibiert wurden, nicht jedoch durch Vorinkubation mit BSA. Die Kontrolle mit Serum von Gesunden zeigte keinerlei Anfärbung der Ösophagus-Schnitte.

Beispiel 3:

25 3.1. Entwicklung eines Sprue-spezifischen ELISA mit IgA-Antikörpern zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der Sprue

In Polystyrol-Mikroplatten (Greiner Labortechnik, 96 Wells) wurde pro Vertiefung 1 µg Meerschweinchen-Transglutaminase (Sigma T-5398) in 100µl PBS pipettiert und 2 h bei

30 37°C unter leicht rotierenden Bewegungen inkubiert. Nicht gebundene tTG wurde durch Spülen mit PBS (3 x 200µl) entfernt, freie Bindungsstellen der Vertiefungen wurden mit 1 % Rinderserum-albumin (Sigma) in 250 µl PBS über Nacht bei 4 °C blockiert. Nach Waschen mit PBS/0,1 % Tween-20 (3 x 200 µl) wurden die Vertiefungen mit sequentiellen Serum-Verdünnungen in PBS/0,1 % Tween-20 (100 µl) für 1 h bei

35 Raumtemperatur unter leicht rotierenden Bewegungen inkubiert, mit PBS/0,1 % Tween-

- 20 (3 x 200µl) gewaschen und daraufhin mit einem Peroxidase-konjugierten, gegen humanes IgA gerichteten Antikörper aus Kaninchen (Dianova) (1/400 in 100 µl PBS/0,1 % Tween-20) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS (3 x) erfolgte eine 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit je 200 µl 0,1M Citratpuffer, 17,6 mM H₂O₂, 5,5 mM o-Phenylendiaminhydrochlorid (Sigma), pH 4,2 und die anschließende Detektion des gebildeten Farbstoffs im ELISA-Reader (MRX, Dynatech Laboratories) bei 450 nm.
- 10 Getestet wurden 20 Seren von Sprue-Patienten vor und nach Therapie mit Gluten-freier Diät, d.h. in der aktiven und weniger aktiven Phase der Erkrankung. Das Testsystem erwies sich als hoch sensitiv, mit einer guten Korrelation der Werte zur aktiven Phase der Sprue. Die Therapie-Erfolge durch Einhalten einer Diät spiegeln sich in einer Abnahme der IgA-Antikörper gegen die tTG wider. Die große Spezifität zeigt sich in der geringen
- 15 Extinktion (Hintergrund-Level) der Kontrollseren von Gesunden, Patienten mit Colitis ulcerosa, Leberzirrhose, diversen Tumoren, Sjögrens Syndrom u.v.m. (Abb.3).

3.2. Entwicklung einer ELISA mit Antikörpern anderer Klassen zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der Sprue am Beispiel der IgG-Antikörper

20

- Da ca 2 % der Sprue-Patienten eine IgA-Defizienz besitzen, wurden die Seren auf ihre Sensitivität und Spezifität von IgG-Antikörpern gegen tTG getestet. Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 3.1. Es wurde lediglich der Peroxidase gekoppelte anti-human IgA Antikörper (Dianova), gegen einen anti-human IgG Antikörper (Dianova)
- 25 ausgetauscht. Die Werte der Sprue-Patienten entsprachen in ihrer Sensitivität, sowohl vor als auch nach Gluten-freier Diät, den mit IgA Antikörpern erhaltenen Daten. Einige Kontrollseren zeigten leicht erhöhte Werte, was früheren Befunden einer verminderten Spezifität der Endomysium-Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz der IgG-Klasse entspricht (Abb.4).

30

5 **3.3. Entwicklung eines ELISA zur Diagnostik und Verlaufskontrolle anderer**
Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen am
Beispiel der IgG-Antikörper

Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 3.2. beschrieben.

10 Die Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen oder autoimmunen Erkrankungen (Colitis ulcerosa (C.U.), Morbus Crohn, akute Autoimmunhepatitis) zeigten leicht bis mittelgradig erhöhte Werte.

Damit ist durch Einsatz z.B. des IgG-spezifischen ELISAs für Autoantikörper gegen die tTG die Diagnose und Therapiekontrolle von Patienten mit Erkrankungen, welche mit einer Immunreaktion gegen die tTG einhergehen, möglich.

15

Beispiel 4:

Neue Funktion der Gewebe-Transglutaminase (tTG) in der Quervernetzung von Gliadin

20 Während der durch die tTG katalysierten Reaktion ein breites Spektrum an Acyl-Akzeptoren zur Verfügung steht, sind nur wenige Moleküle in der Lage als Acyl-Donoren zu fungieren. In einem in vitro Versuch konnte der durch die tTG vermittelte Einbau von radioaktiv markiertem Putrescin in Gliadin und damit die Funktion von Gliadin als Donor-Substrat der tTG nachgewiesen werden. In 160 µl Puffer (0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,5) wurden 1 µg Substrat (Gliadin bzw.
25 Kontrollproteine wie Albumin), 2 µCi [³H]-Putrescin und 1 µg tTG (aus Meerschweinchen, Sigma) 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 50 %-ige Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und die Proteine wurden bei 4°C über Nacht präzipitiert. Nach Zentrifugation wurden die Pellets mit 10 %-iger TCA gewaschen, in SDS-Probenpuffer gelöst und einerseits in der SDS-PAGE aufgetrennt,
30 andererseits zur Szintillationszählung verwendet. Während bei den Kontrollen kein Einbau an Putrescin festzustellen war, zeigte Gliadin sowohl durch die Daten der Szintillationszählung als auch in der SDS-PAGE einen deutlichen Einbau von [³H]-Putrescin in Gliadin, was belegt, daß Gliadin ein exzellentes Substrat für die tTG darstellt.

Benutzte Abkürzungen

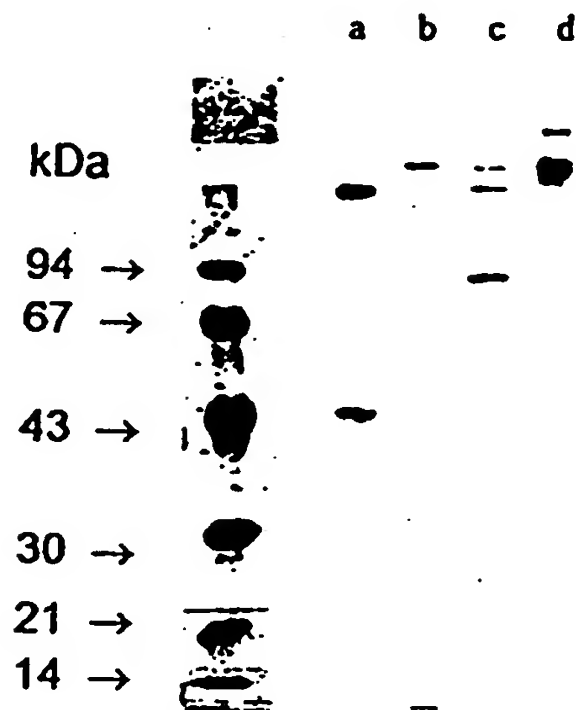
- AK, Antikörper
- APAAP, alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
- 5 BSA, Rinderserumalbumin
- cm, Zentimeter
- DMEM, Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
- EC, Enzymkommission
- ELISA, Enzym-linked immunosorbent assay
- 10 EZM, Extrazelluläre Matrix
- FKS, fötales Kälberserum
- h, Stunde(n)
- H₂O₂, Wasserstoffperoxid
- HLA, humane Lymphozyten-Antigene
- 15 IEL, intraepitheliale Lymphozyten
- Ig, Immunglobulin
- kDa, Kilodalton
- M, molar
- mA, Milliampere
- 20 MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex
- min, Minute(n)
- mM, millimolar
- M_r, relative molekulare Masse
- µg, Mikrogramm
- 25 µl, Mikroliter
- PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese
- PBS, Phosphatpuffer
- PLA₂, Phospholipase A₂
- PVDF, Polyvinylidendifluorid
- 30 SDS, Natriumdodecylsulfat
- TCA, Trichloessigsäure
- TGF, transformierender Wachstumsfaktor
- Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
- tTG, Gewebe-Transglutaminase

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern aus Körperflüssigkeiten durch eine Immunreaktion mit Gewebe-Transglutaminase (tTG), mit tTG-enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß humane IgA- und/oder IgG-Antikörper nachgewiesen werden.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die tTG oder die tTG-enthaltenden Verbindungen humanen, tierischen, synthetischen oder rekombinanten Ursprungs sind.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis in einem an sich bekannten Immunoassay durchgeführt wird, vorzugsweise unter direkter oder indirekter Kopplung eines Reaktionspartners mit einer gut nachweisbaren Markierungssubstanz.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis an einer festen Phase durchgeführt wird.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis in einem ELISA, RIA oder Fluoreszenzimmunoassay erfolgt.
7. Verwendung von tTG, tTG-enthaltenden Verbindungen, deren antigenen Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga zur Diagnose oder Therapiekontrolle von Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen diese Substanzen einhergehen.

- 5 8. Verwendung gemäß Anspruch 7 zur Diagnose oder Therapiekontrolle von
chronisch entzündlichen oder Autoimmunerkrankungen.
9. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 zur Diagnose oder
Therapiekontrolle der Sprue oder Zöliakie.
- 10 10. Orales pharmazeutisches Mittel enthaltend tTG, tTG-enthaltende Verbindungen
deren antigene Strukturen, immunreaktive Sequenzen oder Analoga und
gegebenenfalls pharmazeutisch verträgliche Hilfsstoffe zur Behandlung von
Erkrankungen, die mit einer Immunreaktion gegen diese Substanzen
15 einhergehen.
11. Orales pharmazeutisches Mittel gemäß Anspruch 10 zur Behandlung der Sprue
oder Zöliakie.
- 20 12. Verwendung von tTG, tTG-enthaltenden Verbindungen, deren antigenen
Strukturen, immunreaktiven Sequenzen oder Analoga zur Herstellung von
oralen pharmazeutischen Mitteln zur Behandlung von Erkrankungen, die mit
einer Immunreaktion gegen diese Substanzen einhergehen.
- 25 13. Verwendung gemäß Anspruch 12 zur Herstellung von oralen pharmazeutischen
Mitteln zur Behandlung der Sprue oder Zöliakie.

Abb. 1: Darstellung des Autoantigens in der SDS-PAGE nach Immunpräzipitation (IP)



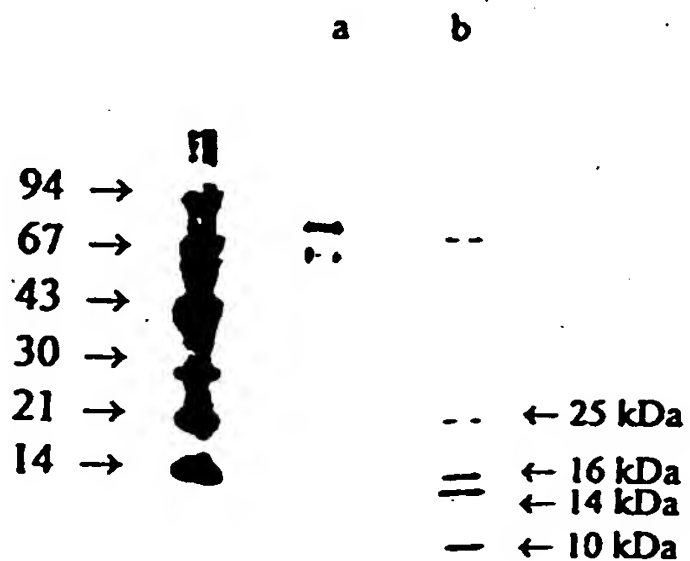
a: IP des Zellysates mit Kontrollserum

b: IP des Mediums mit Kontrollserum

c: IP des Zellysates mit Sprue-Serum, Darstellung des erfindungsgemäßen Autoantigens

d: IP des Mediums mit Sprue-Serum

Abb. 2: Protease-Verdau des Autoantigens mit der Endoprotease Asp-N



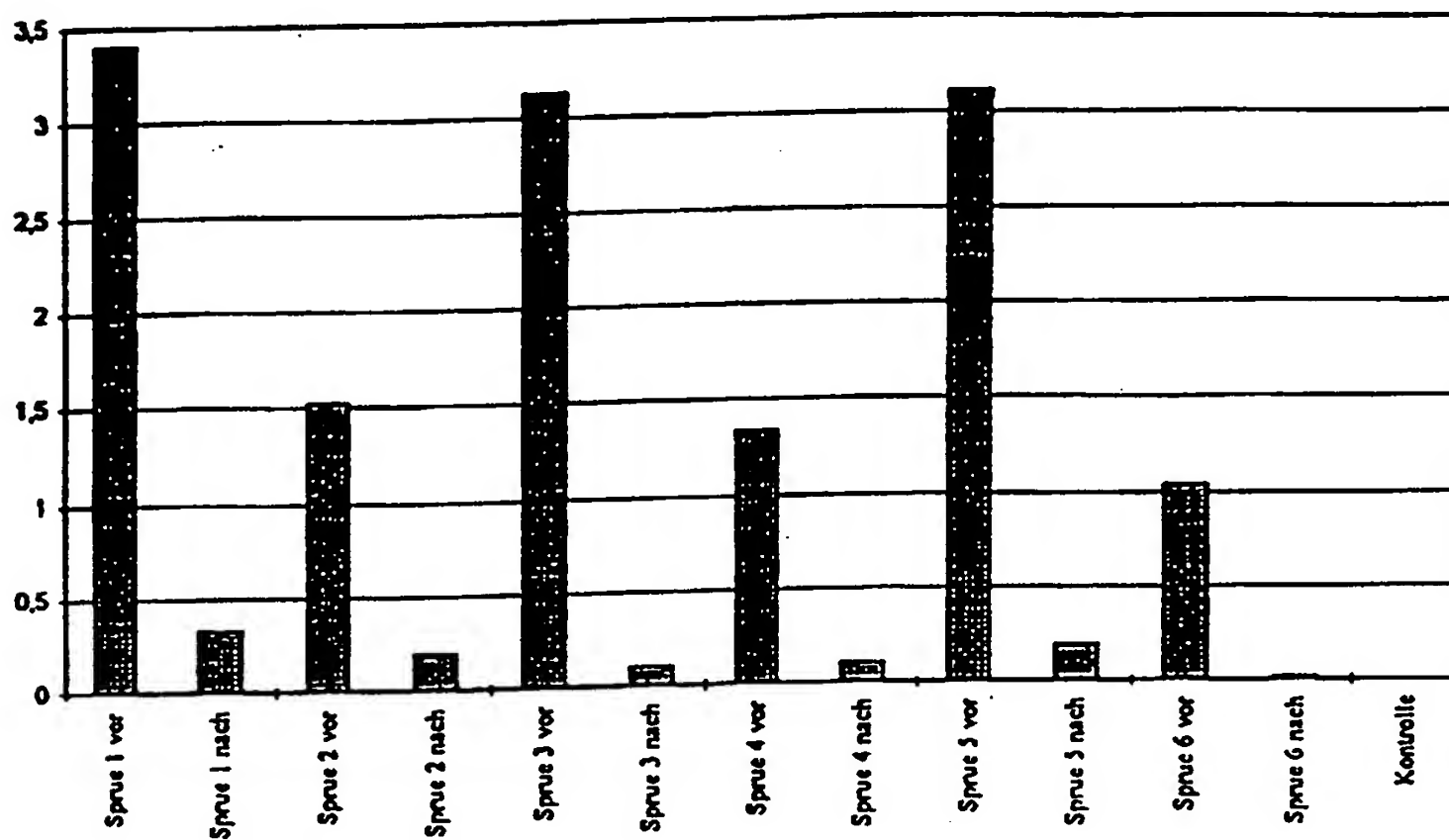
a: erfindungsgemäßes Autoantigen

b: Fragmente des Autoantigens nach Protease-Verdau

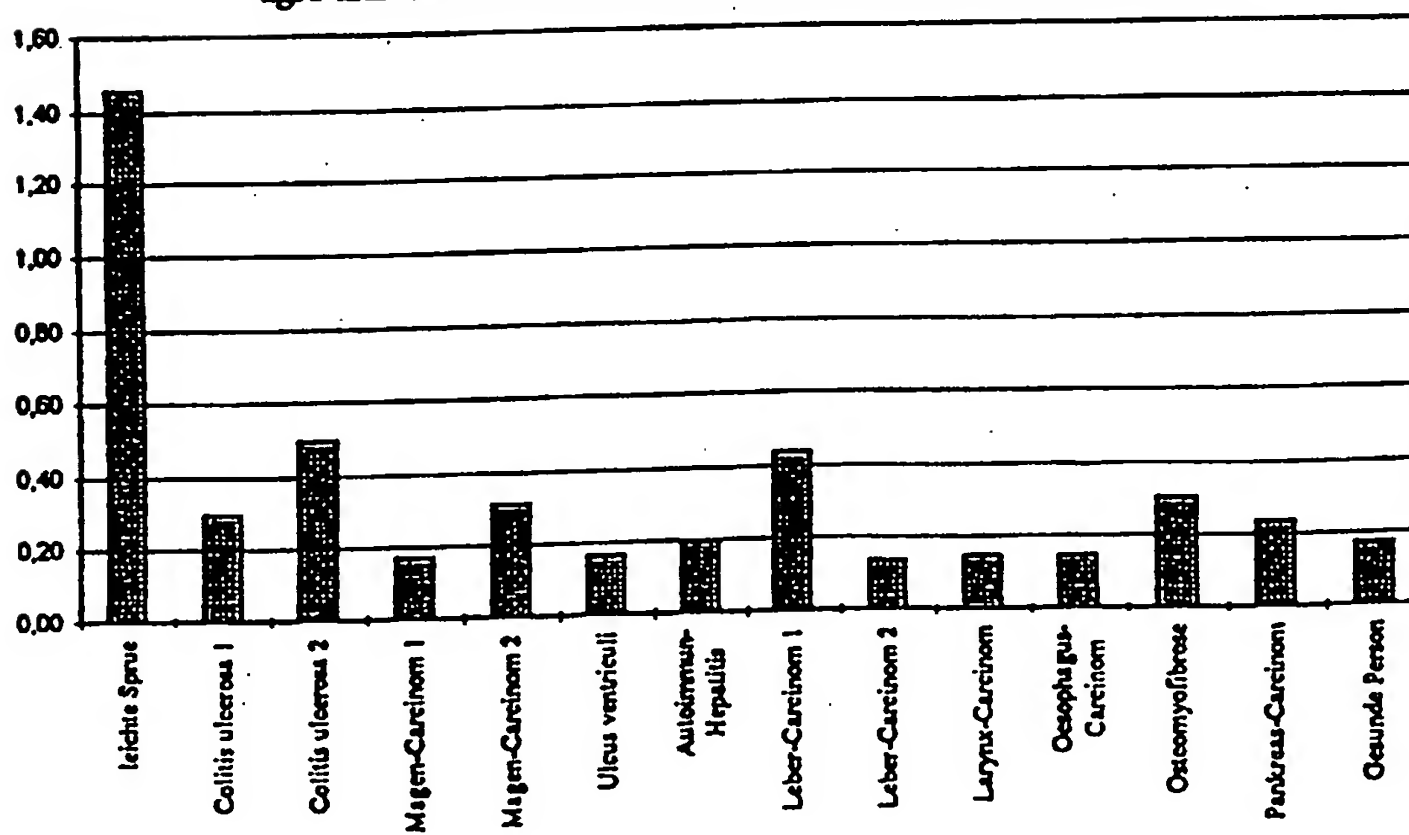
2/3

Abb. 3:

**IgA-ELISA mit Sprue-Seren vor und nach Gluten-freier Diät
(Serum-Verdünnung 1/400)**



IgA-ELISA mit Kontrollseren (Serum-Verdünnung 1/200)



3/3

Abb. 4:

**IgG-ELISA mit Sprue-Seren vor und nach Gluten-freier Diät
(Serum-Verdünnung 1/400)**

